

# Hepatocyte transplantation

Citation for published version (APA):

Vroemen, J. P. A. M. (1987). *Hepatocyte transplantation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19870618jv>

**Document status and date:**

Published: 01/01/1987

**DOI:**

[10.26481/dis.19870618jv](https://doi.org/10.26481/dis.19870618jv)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## CHAPTER 8

---

### Summary and conclusions

At present, a satisfying treatment for most hereditary enzyme deficiency diseases is not available. Experimental and clinical evidence exists that transplantation of the liver from a nondeficient donor may result in cure of hepatic based metabolic disorders. In clinical practice however, the indication for liver transplantation in such cases is the cirrhosis, due to or complicating the enzymatic defect, and not the deficiency itself. A more attractive approach to the treatment of these diseases would be the transplantation of liver cells. This technique would offer considerable advantages compared to whole (or auxilliary) liver transplantation, such as a less hazardous operative procedure, the possibility of long-term cryopreservation of isolated liver cells and the potential use of one donor organ for the benefit of multiple recipients. In this thesis aspects of experimental hepatocyte transplantation (HTX) relevant to the treatment of enzyme deficiency diseases were investigated.

An overview of the literature on HTX is given in Chapter 1. In addition, this chapter provides the rationale of and an introduction to the experimental work presented in this thesis. The first reports on HTX describe a therapeutic effect of HTX in the Gunn rat. This rat strain suffers from a total lack of bilirubin UDP-glucuronyl transferase (BGT), and is congenitally jaundiced. After HTX with hepatocytes from nondeficient donor rats, total plasma bilirubin (TB) levels decreased in the recipient Gunn rats. The mechanism of action of HTX, underlying this therapeutic effect, was subject of investigation in the first experiments, which are described in Chapter 2. A significant, but only transient decrease in total plasma bilirubin (TB) levels was obtained, when allogenic hepatocytes from normal Wistar rats were transplanted into the spleen of the Gunn rat. In Gunn rats treated with Gunn hepatocytes TB did not decline. Rejection of the Wistar donor cells occurred, whereas the syngenic Gunn hepatocytes survived in the spleen. Analysis of bile of immunosuppressed Gunn rats that received Wistar hepatocytes, demonstrated the presence of the products of the missing enzyme BGT, bilirubin mono- and diglucuronide. Bile from immunosuppressed Gunn rats that had received non-viable hepatocytes, Gunn hepatocytes or suspension buffer did not contain bilirubin glucuronides. Sequential bile analyses in non-immunosuppressed HTX-treated Gunn rats showed that the appearance of BGT activity was only transient because of rejection of the Wistar liver cells. It was concluded that the decrease of TB in the Gunn rat after HTX was caused by the appearance of BGT activity, provided by metabolically active non-

deficient donor hepatocytes. Rejection of these donor hepatocytes abrogated the therapeutic effect.

In order to avoid rejection of normal donor hepatocytes in this animal model of congenital jaundice, the enzymatic defect of the Gunn rat was "transferred" to a normal inbred Wistar rat. This was achieved at the "Proefdierencentrum" (Laboratory Animal Centre) of the Catholic University of Leuven, Belgium. After eight backcross-intercross breeding cycles, starting with the inbred Gunn rat strain (as donor of the "jaundice gene") and the inbred normal R/APfd Wistar strain, the new R/APfd-j/j rat strain (j/j stands for homozygously jaundiced) was obtained. Blood and bile analyses provided evidence that this rat strain exhibited the identical enzymatic defect as the Gunn rat. In a series of transplantation experiments (including HTX) and in vitro monitoring of histocompatibility, it was demonstrated that the new R/APfd-j/j rat was congenic and fully histocompatible with the R/APfd Wistar rat. The development and characterization of biochemical and biological features of this rat strain are described in Chapter 3.

In Chapter 4, the R/APfd-j/j strain was used to study whether intrasplenic HTX resulted in a long-term therapeutic effect. A permanent fall in TB was observed in these BGT-deficient rats after treatment with R/APfd donor cells. At six months post-HTX, BGT activity was present in the recipient R/APfd-j/j rats as assessed by the presence of bilirubin glucuronides in their bile collections. Hepatocyte survival was demonstrated in all recipients by histological examination of the spleen. Splenectomy performed at 11 weeks post-HTX reduced the biliary excretion of bilirubin glucuronides, but did not abolish it. This showed that part of the donor cells nidated and survived in the liver and also remained functional in this organ. The spleen is generally accepted as a suitable location for inoculation of isolated hepatocytes, because in this organ both survival and histological examination of the hepatocellular graft are possible. In view of the fact that the pancreas is of the same embryological origin as the liver and produces hormones to which "hepatotrophic" properties are ascribed (insulin and glucagon), the pancreas was considered as a possible acceptor organ for hepatocytes. Morphology and function of hepatocytes transplanted into the pancreas of syngenic or congenic recipient rats were studied in Chapter 5. Hepatocytes formed aggregates in the interlobular spaces and survived with intact morphology. Histological, cytochemical and functional studies undertaken in the R/APfd-j/j rat at 3 months post-HTX provided definite proof for the intact metabolic activities of intrapancreatic R/APfd liver cells. However, intrasplenic HTX appeared to be more effective than intrapancreatic HTX in the treatment of the R/APfd-j/j rat, since biliary excretion of bilirubin glucuronides and the lowering of TB were more pronounced in the recipients with an intrasplenic transplant.

In the preceding chapters, the therapeutic effect of HTX was clearly demonstrated. In spite of this, normalization of TB levels was never attained. It could reasonably be assumed, that the number of grafted donor hepatocytes was the limiting factor determining the therapeutic result in this enzyme deficiency disease. A slow but

progressive decline of TB in the six months posttransplant course of HTX-treated R/APfd-j/j rats (Chapter 4) suggested that proliferation of the R/APfd hepatocytes resulted in an increase of donor liver mass. On the other hand, signs of mitosis were not observed on histological examination. Data in the literature concerning the proliferative behaviour of transplanted hepatocytes were often contradictory. The cytokinetic behaviour of intrasplenic donor hepatocytes was studied in Chapter 6. Immunocytochemical visualization of S-phase cells, pulse labeled with a thymidine analogue (bromodeoxyuridine, BrdU), revealed that syngenic donor hepatocytes proliferated at a fairly constant rate (their proliferation index amounted to about 3%). These studies were performed at 12 weeks and at 20 weeks post-HTX. Furthermore, a method, based on hepatocellular GLDH content, was developed for the quantification of liver tissue present in spleen. Evidence was provided that continuous proliferation in the hepatocellular transplant did result in an increase of total intrasplenic liver mass. After partial resection of the host liver, the intrasplenic hepatocytes exhibited a shortlived increase in proliferation index. However, this did not result in increased intrasplenic liver mass. It was postulated that the proliferative stimulus provided by partial hepatectomy was of too short duration to have a demonstrable effect on intrasplenic liver mass.

In previous reports, graft survival was verified by postmortem histological examinations of the spleen of the HTX-treated rats. In Chapter 7, *in vivo* dynamic  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA scintigraphy was evaluated for the monitoring of hepatocellular graft survival.  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA is a technetium-labeled hepatobiliary imaging agent that is rapidly excreted into bile. Scintigraphic studies were performed in R/APfd-j/j rats that had undergone intrasplenic HTX with R/APfd hepatocytes 3 months before. These studies showed that the spleens of these rats accumulated  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA. Histological examination of the spleen and bile assays on the presence of bilirubin glucuronides confirmed functional survival of the R/APfd hepatocytes. The kinetics of  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA uptake in the HTX-treated spleens were similar to that of  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA uptake in the liver parenchyma, indicating normal function of the intrasplenic hepatocytes. It was concluded that  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA scintigraphy can be considered as a successful method for graft monitoring after intrasplenic HTX. This method would allow repeated investigations in the individual animal and might be a valuable tool in the monitoring of intrasplenic liver mass.

In summary, the investigations presented in this thesis have demonstrated that isolated hepatocytes survive and continue their metabolic activity after transplantation into an appropriate acceptor organ, when rejection is avoided. The sustained function of donor liver cells can be applied in the treatment of hepatic based inborn errors of metabolism, as was shown in a rat model of congenital enzyme deficiency disease.

As to the potential clinical applications of HTX, many questions still go unanswered. However, the possibilities for future use of this transplantation method now seem to crystalize. Initially, HTX was proposed as a new treatment modality for

enzyme deficiency disease and life-threatening liver failure. Work of others has provided evidence that transplantation of intact hepatocytes is not required for a therapeutic effect in acute liver failure. A still undefined heat-stable factor released from liver cells, which was also present in liver cytosol, appeared to enhance liver regeneration and was found to be responsible for the improved cure rate in acute hepatic failure. In contrast, in this thesis it has been shown, that long-term success of HTX in the treatment of enzyme deficiency disease is dependent on the survival of nondeficient donor hepatocytes. In view of these facts, the potential clinical application of HTX at present may be the treatment of enzyme deficiency diseases. The applicability of HTX for treatment of enzyme deficiency diseases in clinical practice may be restricted by the quantity of transplanted liver cells. This quantity might be too small to achieve complete cure of the deficiency (as was observed in the animal model used in the presented studies). It should be noted however, that in the specific enzymatic defect of the BGT-deficient rat, the amount of donor liver tissue required for the conjugation of all bilirubin may be higher than the amount that would be needed in the treatment of other enzyme deficiencies. In many enzyme deficiency states, the presence of a minute quantity of the lacking enzyme would suffice to eliminate symptomatic disease (e.g. phenylketonuria). In this context, it is also worth mentioning that spontaneous proliferation of donor hepatocytes transplanted into the spleen resulted in a steady increase of donor liver tissue mass. This event might well have clinical consequences. The possibility to influence the proliferative activity of the hepatocellular transplant is relevant in this respect. The combination of HTX and DNA technology would be an important and intriguing development. In principle, it is now feasible to transfect isolated or cultured hepatocytes (obtained from an enzyme-deficient patient) with the DNA sequence coding for the lacking enzyme. Autotransplantation of these transfected cells would obviate the need of immunosuppression and could result in cure of the patient. The data obtained in the studies of this thesis provide a rational basis for such treatment. Although further research into HTX is required, the conclusion seems justified that HTX offers perspectives for future clinical use in the treatment of enzyme deficiency diseases.

## Résumé et conclusions

Actuellement il n'existe pas encore de thérapeutiques satisfaisantes pour la plupart des erreurs innées du métabolisme. Des études expérimentales et cliniques ont montré que la greffe d'un foie prélevé sur un donneur sain permet la guérison des déficiences enzymatiques d'origine hépatique. La seule indication de transplantation hépatique dans ces cas réside davantage dans la cirrhose consécutive ou compliquant le déficit enzymatique, plutôt que dans la déficience enzymatique elle-même. La transplantation d'hépatocytes isolés constitue une alternative attractive du traitement de ces maladies. Cette technique offre de nombreux avantages par rapport à la greffe de l'organe entier. L'intervention chirurgicale comporte moins de risques, les cellules du donneur peuvent être conservées par cryopréservation, et plusieurs patients peuvent être traités à partir des hépatocytes issus d'un seul organe donneur. Dans cette thèse certains aspects de la transplantation hépatocellulaire expérimentale sont étudiés. Ils se rapportent au traitement des déficiences enzymatiques héréditaires.

Le Chapitre 1 présente une revue de la littérature sur les résultats obtenus jusqu'à ce jour avec la greffe expérimentale d'hépatocytes. Ce chapitre contient en outre une introduction des expériences accomplies. Les premières tentatives de transplantation hépatocellulaire décrivent comment la greffe d'hépatocytes permet une réduction de l'hyperbilirubinémie causée par une déficience héréditaire totale de l'enzyme bilirubine glucuronyltransférase dont souffrent les rats Gunn. Cet enzyme lie le pigment biliaire (bilirubine) à un glucide, permettant son excrétion aisée dans la bile. L'absence totale de cet enzyme cause chez le rat étudié un ictère permanent. Il est apparu que la bilirubinémie du rat Gunn diminuait après transplantation d'hépatocytes de rats normaux. Dans le Chapitre 2 on a étudié comment la greffe d'hépatocytes pouvait induire cet effet thérapeutique. Une réduction manifeste, bien que temporaire, de la bilirubinémie a été obtenue après injection dans la rate des rats Gunn d'hépatocytes de rats sains (greffe allogénique). Lorsque des hépatocytes de rats Gunn furent utilisés (greffe syngénique) la bilirubinémie initiale ne s'est pas modifiée. Les expérimentations ont montré que les hépatocytes sains étaient rejetés, tandis que les hépatocytes Gunn étaient tolérés par le receveur Gunn. L'analyse de la bile des rats Gunn temporairement immunodéprimés (par irradiation) a montré que, en la présence d'hépatocytes normaux fonctionnels dans le rat Gunn, les produits de l'activité enzymatique déficiente (les glucuronides de bilirubine) étaient formés. Ces substances ne furent pas retrouvées lorsque des hépatocytes normaux détruits artificiellement ou des hépatocytes Gunn étaient greffés. En l'absence de tout traitement immunosuppresseur, on nota que la bile des rats Gunn, greffés à l'aide des hépatocytes normaux, ne contenait des glucuronides de bilirubine que pendant un temps court. A partir de ces données on a conclu que la chute de bilirubinémie chez le rat Gunn, après une greffe d'hépatocytes sains, était causée par l'apparition de l'enzyme ab-

sent contenu dans les hépatocytes greffés. L'effet thérapeutique disparaissait en même temps que le rejet des cellules greffées.

Afin d'étudier les résultats de la transplantation hépatocellulaire à long terme chez le rat ictérique, il était nécessaire que les hépatocytes des rats normaux ne soient pas rejetés. Dans le centre d'animaux de laboratoire (Proefdierencentrum) de la Katholieke Universiteit Leuven, Belgique, une nouvelle lignée de rats a été créée, à partir du rat Gunn et d'une lignée de rats Wistar normaux (la lignée R/APfd). Cette nouvelle lignée (R/APfd-j/j) avait la même déficience enzymatique que le rat Gunn (j/j indique la déficience enzymatique héréditaire), mais possédait pour le reste les caractéristiques tissulaires de la lignée normale R/APfd. Dans ce modèle, les cellules du rat R/APfd ne sont plus reconnues comme "étrangères" par le rat R/APfd-j/j et donc plus rejetées (lignées congénétiques). La création de cette nouvelle lignée de rats R/APfd-j/j est décrite dans le Chapitre 3, ainsi que les expériences qui ont été faites pour démontrer aussi bien la déficience enzymatique que la congénécité avec la lignée R/APfd.

Dans le Chapitre 4, on a utilisé cette nouvelle lignée de rats pour vérifier si la greffe d'hépatocytes avait un effet thérapeutique durable sur le rat présentant une déficience enzymatique. On nota une réduction permanente de la bilirubinémie chez le rat R/APfd-j/j, après injection intrasplénique d'hépatocytes R/APfd. Six mois après la transplantation, la bile des animaux greffés contenait toujours des glucuronides de bilirubine, signe de la présence de l'enzyme déficient. Il fut également démontré avec des techniques histologiques que les hépatocytes du donneur sain survivaient dans la rate des rats transplantés. Après splénectomie, il apparaissait que des glucuronides de bilirubine étaient toujours produits chez le rat receveur en moindre quantité toutefois. Cette observation a été attribuée à la migration intrahépatique par voie portale des cellules du donneur pendant l'injection intrasplénique.

En général la rate est considérée comme un endroit approprié pour la greffe d'hépatocytes, non seulement parce que ces cellules peuvent y survivre, mais aussi parce qu'elles peuvent y être étudiées facilement à l'aide de techniques histologiques courantes. Etant donné l'origine embryologique commune du foie et du pancréas et le fait que ce dernier soit la source d'hormones hépatotrophiques (insuline et glucagon), des expériences d'implantation intrapancréatique d'hépatocytes ont été réalisées et rapportées dans le Chapitre 5. On a pu observer que les hépatocytes en provenance de rats syngénétiques ou congénétiques survivaient dans les espaces interlobulaires du pancréas et montraient toujours des signes fonctionnels 3 mois après la transplantation. Après injection intrapancréatique d'hépatocytes R/APfd dans les rats R/APfd-j/j, on nota une diminution de la bilirubinémie et la formation de glucuronides de bilirubine. Cependant, dans ces mêmes conditions expérimentales, il apparaissait que la transplantation d'hépatocytes dans la rate était plus efficace que dans le pancréas, compte tenu de la quantité des glucuronides de bilirubine formés. Les expériences précédentes ont clairement démontré que la greffe d'hépatocytes avait un effet thérapeutique sur le rat ictérique. Malgré cela, une normalisation de la biliburinémie ne fut cependant pas observée. La cause réside probablement dans un nombre trop restreint des cellules greffées. Dans les expériences décrites au Cha-

pitre 4, on a noté, après la transplantation d'hépatocytes R/APfd dans la rate des rats ictériques R/APfd-j/j, dans un premier temps une chute rapide de la bilirubinémie, suivie par une diminution plus lente. Ceci laisserait supposer qu'il existe une réplication des hépatocytes R/APfd, bien qu'on n'ait jamais mis en évidence de signes histologiques de division cellulaire au cours de nos expériences. Les données de littérature étaient également souvent contradictoires en ce qui concerne la prolifération des hépatocytes greffés. Cette question a été étudiée dans le détail dans le Chapitre 6. On se servit alors d'une technique immunocytochimique grâce à laquelle les cellules en phase "S" du cycle cellulaire sont directement visibles dans les préparations histologiques.

Ainsi il a été possible de prouver que les hépatocytes syngénétiques, greffés dans la rate, étaient le siège de division cellulaire. Les études ont été réalisées 12 et 20 semaines après la transplantation. L'indice de prolifération (c'est à dire la proportion des hépatocytes qui est en phase "S" à un moment donné) était d'environ 3%. En outre, nous avons développé une méthode enzymologique permettant de mesurer la quantité de tissu hépatique dans la rate. La concentration de l'enzyme GLDH (existant dans le foie en quantité importante et dans la rate en quantité beaucoup plus faible) a été mesurée dans le tissu splénique des rats greffés. A partir de ces données la quantité de tissu hépatique intrasplénique a pu être déterminée. A l'aide de cette méthode on a pu ainsi démontrer que la prolifération continue des hépatocytes du donneur entraînait une augmentation de la masse de tissu hépatique dans la rate. Après résection partielle du foie du receveur, une régénération hépatique rapide était observée. Dans ces conditions la division des hépatocytes intraspléniques était également stimulée. Cependant, on ne nota pas une augmentation supplémentaire du tissu hépatique du donneur par rapport à sa croissance spontanée. La durée de la stimulation proliférative, induite par l'hépatectomie partielle, était probablement trop courte pour entraîner un effet mesurable.

Au cours des expériences précédentes, on a pu vérifier la survie des hépatocytes greffés à l'aide d'un examen histologique de la rate. Pour cela il fallait sacrifier l'animal receveur. Dans le Chapitre 7 on évalue une nouvelle méthode d'étude de survie de la greffe: la scintigraphie dynamique  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA.  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA est une substance radioactive absorbée spécifiquement par les hépatocytes et ensuite éliminée par voie biliaire.  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA était absorbée par la rate des rats R/APfd-j/j qui avaient reçu une greffe intrasplénique d'hépatocytes R/APfd 3 mois auparavant. Cela n'était pas observé au niveau du tissu splénique des rats R/APfd-j/j non transplantés. Par la corrélation des données de l'histologie, de la scintigraphie et de la détermination biologique des glucuronides de bilirubine dans la bile, on a démontré l'existence d'une association entre l'absorption de  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA par la rate et la présence d'hépatocytes fonctionnels intraspléniques. Il ressortait en outre que la vitesse d'absorption et d'élimination de  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA par la rate était semblable à celle du foie. Ceci illustre un métabolisme normal des hépatocytes greffés. En principe, la scintigraphie  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA permet des mesures itératives sur un même animal, et est donc une méthode élégante pour examiner la survie de la greffe hépatocellulaire.



En résumé, les expériences décrites dans cette thèse ont démontré que des hépatocytes isolés et transplantés dans un organe approprié survivent en conservant leur métabolisme propre, en l'absence de tout processus de rejet. Dans ces conditions la persistance fonctionnelle des hépatocytes greffés pourrait être mise à profit dans le traitement des déficiences enzymatiques du foie.

Les applications cliniques possibles de ce type de transplantation suscitent encore beaucoup de questions, bien que les indications paraissent aujourd'hui plus définies. Initialement la transplantation d'hépatocytes a été proposée comme une méthode de traitement des déficiences enzymatiques et de l'insuffisance hépatique aiguë. Pour ce qui est de cette dernière indication, d'autres auteurs ont montré que la transplantation d'hépatocytes fonctionnels n'est pas nécessaire pour obtenir les résultats observés. Il a été prouvé qu'une substance encore inconnue, issue de ces cellules, stimule le rétablissement du foie malade du receveur. En effet, des extraits hépatiques apparaissaient être aussi effectifs dans le traitement de l'insuffisance hépatique aiguë. Par contre, il a été démontré dans cette thèse que le succès de la greffe d'hépatocytes dans le traitement des déficiences enzymatiques était fonction de toute la machinerie hépatocellulaire. Dès lors, l'indication potentielle de transplantation d'hépatocytes semble limitée actuellement au seul traitement des déficiences enzymatiques.

Il persiste néanmoins le problème de la quantité restreinte des cellules greffées nécessaire à l'obtention d'une guérison totale (comme dans les expériences avec les rats ictériques). Remarquons que la quantité de tissu de donneur, nécessaire pour la conjugation de toute la bilirubine, peut être beaucoup plus importante que la quantité de tissu hépatique nécessaire au traitement d'autres déficiences enzymatiques. En effet, dans un certain nombre de ces affections, la guérison clinique pourrait être obtenue par la présence d'une très petite quantité de l'enzyme déficient (par exemple dans la phénylcétonurie). Dans ce contexte, il est important de mentionner que la prolifération spontanée des hépatocytes greffés dans la rate conduit à une augmentation lente de la masse de tissu hépatique du donneur. En outre, il ressort de cette thèse qu'il est possible d'influencer l'activité de réplication de ces cellules.

La combinaison de la transplantation hépatocellulaire et de la technologie recombinante de l'ADN pourrait représenter un développement important et intéressant. En principe il est possible actuellement de recombinaison le matériel génétique des hépatocytes isolés ou en culture (venant d'un patient avec une déficience enzymatique) avec la séquence de l'ADN nécessaire pour la fabrication de l'enzyme déficient. L'autotransplantation de ces hépatocytes "manipulés" éliminerait le risque de rejet et pourrait conduire à la guérison du malade. Les données obtenues dans cette thèse constituent une base rationnelle pour l'application d'un tel traitement. Bien que des études ultérieures sur cette forme de traitement s'avèrent nécessaires, il semble correct de conclure que la transplantation d'hépatocytes offre des perspectives de traitement des déficiences enzymatiques.

## Samenvatting en conclusies

Momenteel bestaat er voor de meeste erfelijke stofwisselingsziekten, die berusten op een enzymdeficiëntie, nog geen bevredigende behandelingswijze. Experimenteel zowel als klinisch is aangetoond dat de transplantatie van een lever van een gezonde donor de genezing kan bewerkstelligen van enzymdeficienties die hun oorsprong vinden in de lever. De indicatie voor een levertransplantatie in deze gevallen is echter de begeleidende of door de afwezigheid van het enzym veroorzaakte cirrhose, en niet primair de enzymdeficiëntie. Een aantrekkelijke benaderingswijze voor de behandeling van deze ziekten in een eerdere fase zou de transplantatie van levercellen kunnen zijn. Deze techniek zou belangrijke voordelen bieden ten opzichte van levertransplantatie. De operatieve ingreep draagt minder risico, de donorcellen kunnen d.m.v. bevrozing gepreserveerd worden, om op een gunstig moment gebruikt te worden. Bovendien zouden meerdere patiënten behandeld kunnen worden met de levercellen verkregen uit een enkel donororgaan.

In dit proefschrift worden een aantal aspecten van experimentele leverceltransplantatie bestudeerd met betrekking tot de behandeling van erfelijke enzymdeficienties. Hoofdstuk 1 geeft een literatuuroverzicht over de tot dan bereikte resultaten met experimentele leverceltransplantatie, en bevat een inleiding tot de verrichte experimenten.

De eerste verhandelingen over leverceltransplantatie beschrijven hoe deze transplantatietechniek een genezende werking uitoefent op de Gunn rat, een rattenstam, die lijdt aan een overerfbare afwezigheid van het leverenzym bilirubine glucuronyltransferase. Dit enzym bindt galkleurstof (bilirubine) aan een suiker, waardoor dit afvalprodukt makkelijk via de gal wordt uitgescheiden. Door het totaal ontbreken van dit enzym bestaat er een levenslange geelzucht (icterus) bij de betreffende rat. Na de transplantatie van levercellen afkomstig van normale ratten bleek het bilirubinegehalte in het bloed van de Gunn rat te dalen. De wijze waarop leverceltransplantatie dit effect teweegbrengt, is onderwerp van studie in Hoofdstuk 2. Een duidelijke, maar slechts tijdelijke verlaging van het bloedgehalte aan bilirubine werd bereikt, wanneer in de milt van Gunn ratten levercellen van een gezonde rattenstam werden ingespoten (allogene transplantatie). Wanneer levercellen van Gunn ratten werden gebruikt (syngene transplantatie), werd geen bilirubinedaling waargenomen. Het bleek dat de normale levercellen werden afgestoten, en dat de Gunn levercellen werden geaccepteerd door de ontvangende Gunn rat en overleefden in de milt. Door de gal te bestuderen van bestraalde Gunn ratten (die door de bestraling tijdelijk niet konden afstoten) werd duidelijk dat bij de aanwezigheid van levende normale levercellen in de Gunn rat, de produkten van het ontbrekende enzym werden gevormd (het "gebonden" bilirubine, oftewel de bilirubineglucuronides). Deze stoffen werden niet teruggevonden wanneer gedode normale levercellen of Gunn levercellen werden getransplanteerd. Wanneer er geen bestraling werd gegeven bleek, dat de gal van Gunn ratten die

normale levercellen hadden ontvangen slechts gedurende korte tijd bilirubineglucuronides bevatte. Uit deze gegevens kon worden geconcludeerd dat de bilirubinedaling in de Gunn rat na leverceltransplantatie werd veroorzaakt door suppletie van het deficiënte enzym. Deze enzymwerking vond zijn oorsprong in de getransplanteerde levercellen van de normale donorrat, en verdween wanneer deze donorcellen werden afgestoten.

Om de uitwerking van leverceltransplantatie in de icterische rat op lange termijn te kunnen bestuderen was het noodzakelijk ervoor te zorgen dat de levercellen van normale ratten niet werden afgestoten. Er werd in het Proefdierencentrum van de Katholieke Universiteit in Leuven, België, uitgaande van de Gunn rat en een normale rattenstam (de R/APfd stam), een nieuwe rattenstam gekweekt, die dezelfde enzymdeficiëntie heeft als de Gunn rat, maar verder de erfelijke eigenschappen bezit van de normale R/APfd rattenstam. Dit resulteerde in het ontstaan van de R/APfd-j/j stam (j/j geeft de erfelijke enzymdeficiëntie aan). Omdat de overige erfelijke eigenschappen van de R/APfd-j/j rat nu gelijk zijn aan die van de R/APfd rat, worden cellen van de normale R/APfd rat niet als "vreemd" herkend, en dus niet afgestoten door de R/APfd-j/j rat (congene stammen). De totstandkoming van deze nieuwe R/APfd-j/j rattenstam en de proeven, die werden verricht om zowel de enzymdeficiëntie als de congeniciteit met de R/APfd stam aan te tonen, worden beschreven in Hoofdstuk 3.

In Hoofdstuk 4 wordt een studie beschreven met als vraagstelling of leverceltransplantatie ook een langdurige genezende werking heeft op een enzymdeficiënte rat. In deze studie werd gebruik gemaakt van de congenetische R/APfd en R/APfd-j/j stammen. Een blijvende daling van het bilirubine gehalte trad op in de R/APfd-j/j rat, na injectie van R/APfd levercellen in de milt. Zes maanden na transplantatie bleek de gal van de getransplanteerde dieren nog steeds bilirubineglucuronides te bevatten, ten teken van de suppletie van het deficiënte enzym. Tevens werd aangetoond met histologische technieken dat de levercellen van de gezonde donoren overleefden in de milt van de deficiënte ratten. Na het verwijderen van de milt bleek dat er nog steeds (alhoewel veel minder) bilirubineglucuronides gevormd werden in de behandelde rat. Dit werd toegeschreven aan het doorstromen van donorcellen via de poortader naar de lever van de getransplanteerde ratten, alwaar deze cellen ook overleven. In het algemeen wordt de milt beschouwd als een goede plaats om levercellen in te transplanteren, omdat deze in dit orgaan kunnen overleven, en ook makkelijk bestudeerd kunnen worden met gangbare histologische technieken. Gezien het feit dat de alvleesklier (pancreas) van dezelfde embryologische oorsprong is als de lever en de bron is van hormonen die een werking uitoefenen op de lever, werd een onderzoek uitgevoerd om de pancreas te testen als ontvangend orgaan van de levercellen. Deze experimenten worden beschreven in Hoofdstuk 5. Levercellen afkomstig van ratten van eenzelfde ingeteelde stam bleken zich te nestelen in de pancreas en na 3 maanden nog steeds tekenen te tonen van normale stofwisselingsprocessen. Wanneer in de pancreas van R/APfd-j/j ratten levercellen van R/APfd ratten werden ingespoten, bleek dit te resulteren in verlaging van het bilirubinegehalte, en de vorming van bilirubine-

glucuronides. Desondanks bleek in hetzelfde experiment dat leverceltransplantatie in de milt effectiever was dan transplantatie in de pancreas, gemeten aan de hoeveelheid gevormde bilirubineglucuronides.

In de voorafgaande experimenten werd duidelijk aangetoond dat leverceltransplantatie een therapeutisch effect had in de icterische rat. Een normalisering van het bilirubine gehalte werd echter nooit bereikt. De hoeveelheid getransplanteerde cellen was waarschijnlijk de beperkende faktor. In de experimenten van Hoofdstuk 4 werd er, na de transplantatie van R/APfd levercellen in de milt van icterische R/APfd-j/j ratten, een aanvankelijk snelle en blijvende bilirubinedaling vastgesteld, gevolgd door een verdere langzame daling. Dit deed het vermoeden rijzen dat een delingsproces van de R/APfd levercellen een toename van de hoeveelheid niet-deficient leverweefsel veroorzaakte. Hiertegen pleitte echter dat bij routine histologisch onderzoek in onze experimenten nooit tekenen van zulk delingsproces waren waargenomen. Ook de literatuurgegevens waren vaak tegenstrijdig wat betreft het delingsgedrag van getransplanteerde levercellen. Deze kwestie werd nader bestudeerd in Hoofdstuk 6. Hierbij werd gebruik gemaakt van een techniek, die cellen welke hun erfelijk (DNA) materiaal verdubbelen (een onderdeel van het celdelingsproces), herkenbaar maakt in histologische preparaten. Door middel van deze techniek kon worden aangetoond dat levercellen van donorratten van dezelfde soort als de ontvanger (syngene transplantatie) na transplantatie in de milt een continu delingsproces vertoonden. De studies werden verricht 12 en 20 weken na transplantatie. De proliferatie-index (dat gedeelte van de levercellen, dat in deling is op een bepaald moment) bedroeg ongeveer 3%. Bovendien werd een methode ontwikkeld om de hoeveelheid leverweefsel in de milt te kunnen bepalen. De hoeveelheid van een bepaald enzym (GLDH), dat in grote concentraties in de lever, en in lage concentraties in de milt voorkomt, werd gemeten in de milt van getransplanteerde ratten. Op basis van deze metingen werd de hoeveelheid leverweefsel in de milt bepaald. Met behulp van deze methode kon worden aangetoond dat het continue delingsproces van donorcellen resulteerde in een toename van de hoeveelheid leverweefsel in de milt van het getransplanteerde dier. Wanneer de lever van de getransplanteerde rat gedeeltelijk werd verwijderd (dit geeft aanleiding tot snelle deling van levercellen ter compensatie van het verwijderde leverweefsel) bleek dat ook de getransplanteerde levercellen kortdurend werden gestimuleerd tot deling. Dit veroorzaakte echter geen extra toename van donor leverweefsel in vergelijking met de spontane groei ervan. De duur van de stimulatie tot deling was waarschijnlijk te kort om zo'n toename te bewerkstelligen.

In voorgaande experimenten werd de overleving van getransplanteerde levercellen geverifieerd door middel van histologisch onderzoek van de milt. Hiertoe moest echter het proefdier opgeofferd worden. In Hoofdstuk 7 wordt een nieuwe methode geëvalueerd om de transplantatoeverleving te volgen: dynamische  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA scintigrafie.  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA is een radioactieve stof die specifiek door levercellen wordt opgenomen en vervolgens wordt uitgescheiden via de galwegen.  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA bleek opgenomen te worden in de milt van R/APfd-j/j ratten, die 3 maanden tevoren een leverceltransplantatie (met R/APfd levercellen) in de milt hadden ondergaan. Dit gebeurde

niet in de milt van R/APfd-j/j ratten die in plaats van een leverceloplossing een injectie van een zoutoplossing in de milt hadden ontvangen. Het histologisch onderzoek en de galanalyse op de aanwezigheid van bilirubineglucuronides bleken te correleren met dit scintigrafisch onderzoek. Uit deze studie bleek bovendien dat de snelheid van  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA opname en uitscheiding in de milt ongeveer dezelfde was als de opname- en uitscheidingsnelheid in de lever. Dit illustreerde dat stofwisselingsprocessen in de getransplanteerde levercellen normaal plaatsvonden.  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA scintigrafie heeft het voordeel dat herhaaldelijke metingen in eenzelfde proefdier mogelijk zijn, en is daarom een elegante methode om transplantaatoverleving aan te tonen.

Samenvattend kan gezegd worden dat de onderzoeken in dit proefschrift hebben aangetoond dat geïsoleerde levercellen na transplantatie in een geschikt orgaan overleven met behoud van hun specifieke stofwisseling, wanneer afstoting kan worden voorkomen. Het feit dat levercellen na transplantatie hun functie behouden kan worden toegepast in de behandeling van stofwisselingsziekten van de lever. Dit werd aangetoond in proeven met enzymdeficiente ratten.

Ten aanzien van de mogelijke klinische toepassingen van leverceltransplantatie blijven er vragen open. Nochtans lijken de toekomstmogelijkheden van leverceltransplantatie nu beter omlijnd. Aanvankelijk werd leverceltransplantatie een rol toebedacht bij de behandeling van enzymdeficienties en bij ernstige leverziekten. Deze laatste indicatie lijkt minder waarschijnlijk. Uit het werk van anderen bleek namelijk dat niet de transplantatie van levende cellen, maar een nog onbekende stof afkomstig van deze cellen, de zieke lever van de ontvanger sneller deed herstellen. Leverextracten bleken even effectief in de behandeling van deze leverziekten. In dit proefschrift werd experimenteel aangetoond, dat het succes van leverceltransplantatie bij enzymdeficienties wél afhangt van de aanwezigheid van overlevende nietdeficiente levercellen. Leverceltransplantatie lijkt daarom mogelijk een toepassing te hebben in de behandeling van enzymdeficienties.

Een probleem zou kunnen zijn dat de hoeveelheid getransplanteerde cellen te klein zou blijken om een volledige genezing te verkrijgen (zoals dit inderdaad het geval was in de onderhavige proeven met icterische ratten). Hierbij moet opgemerkt worden, dat de hoeveelheid donorweefsel benodigd voor de conjugatie van al het gevormde bilirubine, veel groter kan zijn dan de hoeveelheid leverweefsel die nodig is voor de behandeling van andere enzymdeficienties. In een aantal van deze ziekten zou de aanwezigheid van slechts een zeer geringe hoeveelheid van het ontbrekende enzym al genoeg zijn om een klinische genezing te kunnen bewerkstelligen. In deze context is het ook vermeldenswaard dat de levercellen na transplantatie in de milt een spontaan celdelingsproces vertonen, hetgeen een langzame toename veroorzaakt van de hoeveelheid donorweefsel. Bovendien is uit dit proefschrift gebleken dat het mogelijk is de delingsactiviteit van deze cellen positief te beïnvloeden.

De combinatie van leverceltransplantatie en DNA technologie zou een belangrijke en boeiende ontwikkeling zijn. In beginsel is het tegenwoordig mogelijk in geïsoleer-

de levercellen afkomstig van een patient met een enzymdeficientie, het benodigde genetische materiaal in te brengen om de produktie van het ontbrekende enzym mogelijk te maken (DNA recombinatie technologie). De transplantatie van deze "bewerkte" lichaamseigen levercellen zou zonder afstotingsproblemen zijn en kunnen resulteren in de genezing van de patient. De gegevens die in dit proefschrift werden gepresenteerd vormen een rationele basis voor het uitvoeren van zo'n behandeling.